

ТЕМП ВЫКЛЕВА И ЛИЧИНОЧНЫЙ РОСТ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) НА ЭТАПЕ ДОИНКУБАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУЛЬФАТА НИКЕЛЯ *IN VITRO*

А.А. Борщук, Е.С. Гук, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, Пинск

Государственной программой развития аграрного бизнеса на 2016–2020 годы в Беларуси предусмотрено повышение объемов воспроизводства ценных видов рыб, включая товарную форель, к 2020 году до 1200 тонн. Между тем, лишь за 2017 год импорт продукции из форели в нашу страну составил около 6000 тонн.

Дальнейшая интенсификация производства товарной рыбы требует оптимизации приемов ее разведения уже на стадии выклева и выращивания молоди. Одним из возможных подходов в этом плане является воздействие на процесс выклева и рост личинок рыб биогенных факторов, к числу которых относятся микроэлементы, включая металлы с переменной валентностью, к числу которых относится и никель.

Никель, как, впрочем, и ряд других элементов, «двулик». В низких концентрациях – это эссенциальный элемент, необходимый для нормальной жизнедеятельности. Он входит в состав ряда ферментов, в том числе фиксации CO_2 , азота, усвоения железа, участвует в метаболизме H_2 , метаногенезе и ацетогенезе. Недостаточность его пагубно отражается на жизнедеятельности растений. Дефицит никеля у цыплят, свиней, овец и коз сопровождается задержкой роста, ростом смертности, изменениями структуры печени и ее метаболизма [1–6].

Однако в высоких концентрациях этот элемент токсичен и вызывает целый ряд нарушений. В растениях отмечены подавление роста, фотоассимилирующего транспорта, газообмена, фотосинтетического транспорта электронов, реакций цикла Кальвина-Бенсона, анатомии и морфологии листьев и корней, нарушения обмена железа [2, 7]. На линиях клеток животного происхождения продемонстрировано снижение жизнеспособности клеток под действием никеля (II) [8]. Отмечены канцерогенные, генотоксические, иммуноотоксические и мутагенные свойства соединений никеля [9].

Вместе с тем, механизм биологического и токсического действия этого элемента весьма далек от полной ясности [9, 10].

Ранее проводились исследования по установлению минимальной смертельной концентрации (LD50, в течение 96-часов): для радужной форели она составила 19,3 мг/л [10]. Однако влияние никеля на жизнедеятельность гидробионтов остается практически неизученным.

Цель исследования – оценить влияние никеля *in vitro* на темп выклева, жизнестойкость и темп роста радужной форели при доинкубации.

Материалы и методы. Исследования проведены на эмбрионах радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), полученные в форелевом хозяйстве ЗАО «Птичь» (Беларусь, Минская обл., Логойский район). Доинкубацию икры проводили в холодильниках при концентрации сульфата никеля – NiSO_4 в растворах 10, 20 и 40 мг/л (в течение всего периода наблюдения), а также при экспозиции в растворах данных концентраций соли в течении 10 мин. ежедневно. В контрольный вариант соль никеля не добавляли. Количество эмбрионов – по 3 эмбриона в контейнере в восьмикратной повторности для каждой группы.

Во время инкубации ежедневно меняли воду для поддержания режима проточности; было обеспечено отсутствие источника света.

Время наблюдения – до перехода личинок на экзогенное питание. На постоянном уровне поддерживали температуру 10 °С, содержание кислорода, pH 7,6 и другие параметры гидрохимического режима.

Анализируемые признаки: темп выклева, жизнестойкость, а также длина свободных эмбрионов и личинок. Анализ жизнестойкости проводили в условиях отсутствия источников внешнего питания личинок радужной форели.

Коэффициент синхронности выклева (T_z) определяли, как разность между временем достижения 90 (T_{90}) и 10%-го выклева (T_{10}) соответственно [7]. Показатели средней длины получали в результате обработки фотоснимков предличинок и личинок в программе Image J.

Анализ полученных данных проводили в статистической среде R. Нормальность распределения данных подтверждена тестом Шапиро-Уилка. Проверку соблюдения условий однородности групповых дисперсий в выборках осуществляли по тесту Ливина. Для анализа различий между опытными группами использовался одномерный дисперсионный анализ – критерий Тьюки.

Результаты исследования. При постоянном воздействии сульфата никеля значение средней выживаемости *до выклева* составило: 87,5, 100 и 79,16% при концентрации эффектора 10, 20 и 40 мг/л соответственно. В случае 10-минутной экспозиции с солью никеля этот показатель был равен 87,5, 100 и 87,5% при концентрации эффектора 10, 20 и 40 мг/л. Выживаемость контрольной группы равнялась 91,66% (таблица 1).

Таблица 1 – Выживаемость эмбрионов радужной форели до выклева при доинкубации в растворах сульфата никеля различной концентрации

Состояние эмбрионов	Концентрация NiSO ₄ , мг/л						
	10	20	40	10	20	40	Контроль, без добавок
	постоянное воздействие			ежедневно по 10 мин			
Посажено	24	24	24	24	24	24	24
Мертвые особи	3	0.	5	3	0.	3	2
Всего выжило	21	24	19	21	24	21	22
Выживаемость до выклева %	87,5	100	79,16	87,5	100	87,5	91,66

После выклева при постоянном воздействии концентрации сульфата никеля при концентрации эффектора 10, 20 и 40 мг/л 10, 20 и 40 мг/л выживаемость равнялась 29,16, 91,66 и 79,16% соответственно. Тогда как при 10-минутной экспозиции с данным эффектором в упомянутых концентрациях – 87,5, 100, и 87,5%. В контрольной группе этот показатель составил 75% (таблица 2).

Максимальные значения выживаемости отмечены при концентрации соли никеля 20 мг/л (10 минут) и 20 мг/л, где этот показатель превышал контроль на 25 и 17,66% при 10-минутной экспозиции или постоянном воздействии соответственно.

Судя по результатам исследований, единичный выклев раньше всего начался при концентрации соли никеля 10 мг/л и экспозиция 10 минут (таблица 3).

Минимальное значение коэффициента синхронности выклева – 3 – показателя важного для производства отмечено при концентрации 10 мг/л и при постоянном воздействии эффектора и при экспозиции 10 мин. Это означает, что в этих группах синхронность выклева равна таковой в контрольной группе.

Таблица 2 – Выживаемость эмбрионов радужной форели после выклева при доинкубации в растворах сульфата никеля различной концентрации

Состояние эмбрионов	Концентрация NiSO ₄ , мг/л						Контроль, без добавок
	10	20	40	10	20	40	
	постоянное воздействие			ежедневно по 10 мин			
Посажено	24	24	24	24	24	24	24
Мертвые особи	17	2	5	3	0	3	6
Всего выжило	7	22	19	21	24	21	18
Выживаемость до выклева, %	29,16	91,66	79,16	87,5	100	87,5	75

Таблица 3 – Показатели темпа выклева эмбрионов радужной форели при доинкубации в растворах сульфата никеля различной концентрации ($n = 8$)

Исследуемые параметры	Концентрация NiSO ₄ , мг/л						
	10	20	40	10	20	40	Контроль, без добавок
	постоянное воздействие			ежедневно по 10 мин			
День начала первого выклева	18	19	16	16	17	17	18
День начала массового выклева	21	20	23	19	19	19	20
T ₁₀	18	20	16	18	17	18	18
T ₉₀	21	24	25	21	22	23	21
T _z	3	4	9	3	5	5	3

Примечание – T₁₀ – время выклева 10% эмбрионов; T₉₀ – время выклева 90% эмбрионов, T_z – коэффициент синхронизации выклева

Максимальное значение коэффициента синхронности выклева, отмечено при концентрации NiSO₄ 40 мг/л. Вероятно, в этой концентрации соль никеля частично замедляет эмбриональное развитие, что может свидетельствовать о ее токсическом действии.

Средняя длина личинок радужной форели на 18 сутки **после выклева** почти во всех опытных группах (за исключением постоянного воздействия соли никеля в концентрации 10 мг/л) была на 8,7–22,0% большей, чем в контроле (таблица 4). Максимальный эффект отмечен при 10-минутной экспозиции: на 14,8, 22,0 и 16,0% для концентраций сульфата никеля 10, 20 и 40 мг/л соответственно (сдвиги статистически достоверны).

На 73-и сутки, однако, средняя длина личинок опытных групп мало отличалась от контроля. Даже при концентрации эффектора 10 мг/л и постоянном воздействии эта величина превышала таковую в контроле лишь на 14%, а во всех остальных вариантах она колебалась в пределах 2,0–9,5%, что не было статистически достоверно (таблица 5).

Возможно, такая ситуация с вариантом 10 мг/л при постоянном воздействии обусловлена малой выборкой, и при увеличении последней изменения были бы статистически значимы.

Таблица 4 – Средняя длина (мм) личинок радужной форели на 18-е сутки после доинкубации в растворах сульфата никеля различной концентрации

Варианты эксперимента	Mean SE \pm se	n	CV %	Тест Шапиро–Уилка	Тест Ливина	Тест Тьюки
контроль	16,76 \pm 0,40	18	0,12	p>0,05	p>0,05	–
+ NiSO ₄ , 10 мг/л	15,50 \pm 0,60	7	0,11			p>0,05
+ NiSO ₄ , 20 мг/л	18,22 \pm 0,30	22	0,09			p>0,05
+ NiSO ₄ , 40 мг/л	18,35 \pm 0,30	19	0,08			p>0,05
+ NiSO ₄ , 10 мг/л, 10 мин	19,24 \pm 0,40	19	0,09			p<0,01
+ NiSO ₄ , 20 мг/л, 10 мин	20,06 \pm 0,40	22	0,11			p<0,001
+ NiSO ₄ , 40 мг/л, 10 мин	19,44 \pm 0,40	21	0,10			p<0,001

Условные обозначения здесь и далее: Mean – среднее значение длины, SE – стандартная ошибка среднего, CV – коэффициент вариации, %, n – объем выборки

Таблица 5 – Средняя длина (мм) личинок радужной форели на 73-и сутки после доинкубации в растворах сульфата никеля различной концентрации

Варианты эксперимента	Mean SE \pm se	n	CV %	Тест Шапиро–Уилка	Тест Ливина	Тест Тьюки
контроль	19,45 \pm 0,62	6	0,11	p>0,05	p>0,05	–
+ NiSO ₄ , 10 мг/л	22,18 \pm 1,00	6	0,11			p>0,05
+ NiSO ₄ , 20 мг/л	21,43 \pm 0,80	12	0,12			p>0,05
+ NiSO ₄ , 40 мг/л	21,82 \pm 0,06	11	0,005			p>0,05
+ NiSO ₄ , 10 мг/л, 10 мин	19,34 \pm 0,90	3	0,11			p>0,05
+ NiSO ₄ , 20 мг/л, 10 мин	21,30 \pm 0,57	13	0,09			p>0,05
+ NiSO ₄ , 40 мг/л, 10 мин	19,78 \pm 0,71	12	0,12			p>0,05

Закключение. Представленные результаты являются лишь первым шагом исследований в затронутом вопросе. Они демонстрируют достаточно сложное и неоднозначное влияние сульфата никеля на личинки радужной форели, зависящее не только от концентрации этого фактора, но и от времени воздействия и характера экспозиции.

Прежде всего, обращает на себя внимание достаточно высокая выживаемость личинок, в отдельных вариантах превышающая таковую контрольной группы. Далее, как оказалось, в минимальной концентрации сульфат никеля способен ускорять выклев эмбрионов форели.

Более того, в первый период и средняя длина тела личинок в ряде вариантов превосходила таковую контрольной группы.

Это, в определенной мере, свидетельствует в пользу биогенной роли никеля для лососевых рыб. Причина такого действия изучаемого элемента пока неясна, поскольку выяснение ее требует проведения исследований молекулярно-клеточных событий в процессе эмбриогенеза.

В максимальной же концентрации сульфат никеля угнетал процессы онтогенеза радужной форели, однако этот эффект не выглядел катастрофическим.

Судя по имеющейся литературе, изложенные в настоящей статье материалы ранее не были известны. Характер же их позволяет думать, что дальнейшая доработка концентраций соли никеля и режимов воздействия, возможно, позволит улучшить результаты. Дальнейшие эксперименты также целесообразно провести в условиях аквакультуры *in vitro*.

Список использованных источников

1. Liao R.Z Energetics for the mechanism of nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/ R.Z. Liao, Siegbahn P.E.M. // Inorganic Chemistry – 2019. – Vol.58, iss. 2. – P. 7931-7938
2. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities-a review/ M.U. Hassan [et. al.] // Environmental Science and Pollution Research – 2019. – Vol.26, iss. 13. – P. 12673-12688
3. Toxic responses of microorganisms to nickel exposure in farmland soil in the presence of earthworm (*Eisenia fetida*)/ X. Xia [et. al.] // Chemosphere – 2018. – Vol.192. – P. 43-50
4. Expression changes in metal-resistance genes in *Microbacterium liquefaciens* under nickel and vanadium exposure/ G. Fierros-Romero [et. al.] // Current Microbiology – 2017. – Vol.74, iss. 7. – P. 840-847
5. Boron, chromium, manganese, and nickel in agricultural animal production/ J.W. Spears // Biological Trace Element Research – 2019. – Vol.188, iss. 1. – P. 35-44
6. Ragsdale St. W Nickel and the carbon cycle/ St. W. Ragsdale, J. Inorg // Inorganic Biochemistry – 2007. – Vol.101, iss. 11-12. – P. 1657-1666
7. Physiological response and mineral elements accumulation pattern in *Sesuvium portulacastrum* L. subjected in vitro to nickel/ E. Fourati [et. al.] // Chemosphere 2019 – Vol. 219 – P. 463-471
8. Cell viability in normal fibroblasts and liver cancer cells after treatment with iron (III), nickel (II), and their mixture/ S. Terpiłowska [et. al.] // Journal Veterinary Research – 2018. – Vol. 62, iss. 4. – P. 535-542
9. Nickel-induced VEGF expression via regulation of Akt, ERK1/2, NFκB, and AMPK pathways in H460 cells/ J. C. Wand [et. al.] // Environmental Toxicology – 2019. – Vol. 34, iss. 5. – P. 652-658
10. Шилова Н. А. Влияние тяжелых металлов на представителей пресноводного фито - и зоопланктона в условиях засоления: дис. ... канд. биологических наук: 03.02.08 / Шилова Н. А.; Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А. – Саратов, 2014. – 133 с.
11. Литвиненко, Л. И. Определение оптимальных параметров инкубации цист артемии сибирских популяций / Л. И. Литвиненко, М. В. Гуженко // Рыб. хоз-во. – 2007. – № 2. – С. 90–94.